

Zadanie 49

„Badanie bioróżnorodności gatunków z plemienia Brassiceae w celu otrzymania form rzepaku ulepszonych pod względem odporności na patogeny”

(prof. nadzw. dr hab. inż. Michał Starzycki)

Celem zadania było wytwarzanie mieszańców międzygatunkowych techniką in vitro, poszukiwanie genotypów z plemienia *Brassiceae* odpornych na porażenie powodowane przez groźne dla rzepaku patogeny: *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Temat realizowany był w trzech zadaniach: 1/ Wytwarzanie mieszańców międzygatunkowych techniką in vitro oraz wykorzystanie technik klonowania in vitro i in vivo dla otrzymania roślin mieszańców międzygatunkowych. 2/ Poszukiwanie genotypów z plemienia *Brassiceae* odpornych na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. 3/ Badania odporności siewek otrzymanych z mieszańców międzygatunkowych i roślin kontrolnych i donorowych rzepaku, wybranych genotypów na porażenie powodowane przez patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp., a także analizy DNA dla roślin mieszańcowych.

Do krzyżowań międzygatunkowych wykorzystano genotypy roślin matecznych i ojcowskich oraz gatunki pokrewne o zróżnicowanych genotypach. W badaniach wykorzystano następujące gatunki podstawowe: kapustę brukselską *B. oleracea* var. *gemmifera* $2n = 18$ (CC), kapustę pastewną *B. oleracea* var. *acephala* $2n = 18$ (CC), kapustę jarmuż *B. oleracea* var. *acephala* subvar. *Lacinista* $2n = 18$ (CC), oraz *B. campestris* o liczbie chromosomów $2n = 20$ (AA), *B. carinata* $2n = 34$ (BBCC), *B. nigra* $2n = 16$ (BB), *B. juncea* $2n = 36$ (AABB). Do krzyżowań wypierających zostały użyte otrzymane w ubiegłych latach mieszańce alloplazmatyczne - międzygatunkowe oraz mieszańce z cytoplazmą rzepaku *B. napus* (AACC). Po osiągnięciu przez rośliny fazy kwitnienia krzyżowano je tak, aby otrzymane potomstwo posiadało cytoplazmę genotypów wcześniej selekcjonowanych pod względem odporności na porażenie przez patogeny z rodzaju *Alternaria* i *Leptosphaeria*. Otrzymane embriony stadiów: globularnych lub sercowatych zostały nałożone na pożywki agarowe B5 z fitohormonami BAP 1mg/l (cytokinina) i 0,01mg/l IAA (auksyna) przeniesione do warunków fitotronowych o termoperiodzie 15°C – dzień i 10°C – noc oraz 12-sto godzinnym fotoperiodzie. Następnie uzyskane rośliny pokolenia F1 mieszańców międzygatunkowych klonowano w warunkach in vitro. Najlepiej rozwinięte skierowano do dalszych badań. W obrębie powyższych form wykonano 11 udanych przekrzyżowań łącznie 50, z których wypreparowano 159 żywych zarodków. Obecnie rozklonowano 52 nowe genotypy w warunkach in vitro i in vivo w kulturach hydroponicznych oraz w glebie. Celem zadania badawczego 2/ było poszukiwanie genotypów z plemienia *Brassiceae* (*B. oleracea*, *B. campestris*, *B. napus*), odpornych na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp., prace wykonano w warunkach polowych. Każdy obiekt oceniany był (IP, indeks porażenia) na podstawie obserwacji 40 roślin w 3 lub 4 powtórzeniach (120 roślin). Na wybranych obiektach wykonano analizy GC dla wyeliminowania genotypów o zwiększonym udziale związków antyżywniowych. Wyniki indeksu porażenia przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. poszczególnych form zapisano tabelarycznie w taki sposób aby formy odporne w rankingu występowały pod koniec zapisu.

Wyniki odporności mieszańców międzygatunkowych wyrażone Indeksami Porażenia dla *Leptosphaeria* sp. wskazały, że 8 form posiadało odporność na poziomie ok. 2,5%, indeks porażenia tych samych obiektów dla *Alternaria* sp. był na poziomie 4,5%. Badania

prowadzono w warunkach polowych w miejscowościach: Małyszynie, Borowie (HR Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR) i Bąkowie (HR Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR). Wykonano 8 ekspedycji w celu stwierdzenia występowania patogenów: *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Dopiero pod koniec okresu wegetacyjnego zaobserwowano nasilenie chorób, które bonitowano. Na podstawie otrzymanych wyników wyróżniono: genotypy rzepaku oraz grupy odmian charakteryzujące się podwyższoną odpornością na *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. co wykazano statystycznie. Rody i odmiany rzepaku, u których zaobserwowano wyższą rezystencję stanowią potencjalny materiał do dalszych badań związanych z hodowlą odpornościową. Celem zadania badawczego 3/ było stwierdzenie odporności otrzymanych roślin mieszańcowych na porażenie powodowane przez patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. przy użyciu testów odpornościowych w warunkach in vitro. Rośliny – (wybrane) siewki mieszańcowe testowano in vitro testem Williamsa na porażenie powodowane przez najgroźniejsze patogeny grzybowe dla rzepaku: *L. maculans* stadium konidialne *P. lingam*. Dla stwierdzenia czystości gatunkowej użytych w testach grzybów stosowano metodę sekwencjonowania DNA ITS, a przynależność gatunkową określano z banku genów przy pomocy programu NCBI/BLAST. Siewki mieszańców międzygatunkowych przebadano również pod względem odporności na *Alternaria* sp. tą samą metodą z użyciem kultur in vitro. Po zastosowaniu metody kaleczenia łodyg i inokulacji patogenami wyselekcjonowano odporne rośliny donorowe do dalszych badań nad odpornością poligeniczną. Większość bonitowanych roślin wykazywała całkowitą odporność na fomozę. Ponadto na powyższych genotypach nie odnotowano występowania grzybów z rodzaju *Alternaria* sp. Otrzymane potomstwo pochodzące z mieszańców międzygatunkowych posłużyło do badań mechanizmów odporności wybranych roślin na poziomie DNA wspólnie z gatunkami podstawowymi stosowanymi do krzyżowań. Do powyższych badań użyto znane markery molekularne typu RAPD (OPW 04, PO4, PO7 oraz PO5). Każda z prób była powtórzona dwukrotnie obok siebie na żelu agarozowym. Jeden z wybranych starterów (P07) amplifikujący fragment DNA 2500 pz wydaje się być skojarzony z odpornością poligeniczną badanych roślin. Najbardziej obiecującymi gatunkami, które mogą być donorami genów odporności dla *B. napus*, na chorobotwórcze grzyby *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. jest *B. taurica* oraz *B. oleracea* jarmuż. U innych gatunków pokrewnych do *Brassicae* zidentyfikowano także fragment DNA, który może być kojarzony z odpornością roślin na patogeny.